

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年9月19日 (19.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/073181 A1

(51) 国際特許分類⁷:

G01N 27/327

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP02/02191

(22) 国際出願日: 2002年3月8日 (08.03.2002)

日本語

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) 優先権データ:

特願2001-070421 2001年3月13日 (13.03.2001) JP
特願2001-281985 2001年9月17日 (17.09.2001) JP

(71) 出願人および

(72) 発明者: 早出 広司 (SODE,Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東
京都目黒区南1丁目13番16号 Tokyo (JP).

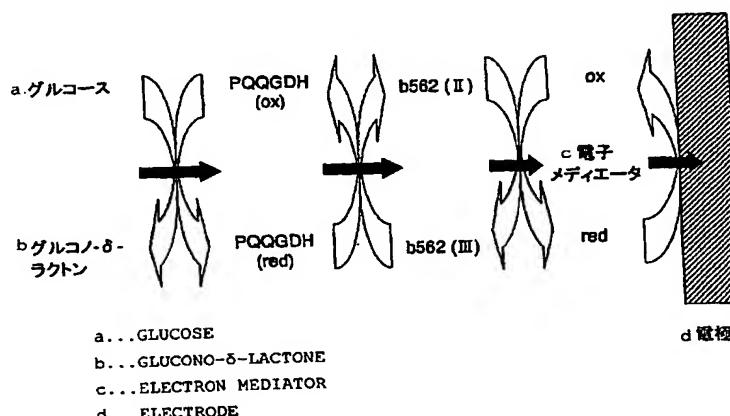
添付公開書類:
— 国際調査報告書

(74) 代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA,Reiko et al.); 〒
100-6036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞
が関ビル36階大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: OXYGEN ELECTRODE

(54) 発明の名称: 酶素電極



WO 02/073181 A1

(57) Abstract: An oxygen electrode having an oxidoreductase (for example, glucose oxidase, cholesterol oxidase, fructosylamine oxidase glucose dehydrogenase) and an electron transfer protein (for example, cytochrome C, cytochrome b562, cytochrome c551); and a sensor characterized by having this oxygen electrode as a working electrode. This oxygen electrode can provide a high response current value.

[統葉有]



(57) 要約:

酸化還元酵素（例えば、グルコース酸化酵素、コレステロール酸化酵素、フルクトシルアミン酸化酵素、グルコース脱水素酵素）と、電子伝達蛋白質（例えば、シトクロームC、シトクロームb 5 6 2、シトクロームc 5 5 1）とを有する酵素電極、ならびに該酵素電極を作用極として用いることを特徴とするセンサーが開示される。この酵素電極は、高い応答電流値を与えることができる。

明細書

酵素電極

技術分野

5 本発明は、酵素電極およびこれを用いるバイオセンサーに関する。

背景技術

酵素電極とは、金電極、白金電極、カーボン電極等の電極表面上に酵素が固定化されている電極である。酵素電極は、酵素の反応特異性を利用して、種々の生

10 理活性物質を特異的に検出するバイオセンサーとして広く用いられている。

例えば、血糖値を簡便かつ迅速に測定しうるグルコースセンサーが開発されて

いる。グルコースセンサー素子としては、グルコースオキシダーゼ (GOD) が最もよく用いられている。GODは、熱に安定であり、安価に大量に供給される

15 酵素であるため、頻繁に用いられてきた。さらに、電極への印加電圧を低下させて夾雑物質の影響を低くするために、測定系にフェリシアン化カリウム等の種々

の電子メディエーターを加えることが試みられている。また、溶存酸素濃度に影響されないメディエーター型のセンサー素子としてグルコース脱水素酵素 (GDH)

15 H) を用いることができる。例えば補酵素結合型のPQQグルコース脱水素酵素

(PQQGDH) の使用が試みられている (特開平10-243786、WO 0

20 0/66744、WO 00/61730)。

また、コレステロール酸化酵素、フルクトシルアミン酸化酵素等を用いて、それぞれ血中のコレステロールやフルクトシルアミンの濃度を測定するための酵素電極も研究されている (Electrochemistry, 68(11), 869-871, 2000)。

25 しかし、これらの酸化還元酵素を酵素電極に応用する場合、電極の応答電流値が低いことが問題であった。これは、これらの酸化還元酵素から電極への、あるいは電子メディエーターへの電子移動速度が低いことが原因である。従って、本発明は、より高い応答電流値を得ることができる酵素電極を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、電極上に酸化還元酵素とともに電子伝達蛋白質を固定化することにより、高い応答値を有する酵素電極が得られることを見いだし、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とを有する酵素成せた。

5 電極を提供する。

酸化還元酵素とは、酸化還元反応を触媒する酵素をいう。好ましくは、酸化還元酵素は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする酸化還元酵素、またはフラビンを補酵素とする酸化還元酵素である。より好ましくは、酸化還元酵素は、グルコース酸化酵素、コレステロール酸化酵素、乳酸酸化酵素、アルコール酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ビリルビン酸酸化酵素、フルクトシルアミン酸化酵素、10 グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコースー3ー脱水素酵素からなる群より選択される。

電子伝達蛋白質とは、生体の酸化還元系において、電子供与体から電子を受け取って還元され、次いで電子受容体に電子を渡して酸化されることのできる蛋白質をいう。好ましくは、電子伝達蛋白質はシトクロームbおよびシトクロームCであり、さらに好ましくはシトクロームb 562である。また、好ましくは電子伝達蛋白質として用いるシトクロームb 562は大腸菌由来のシトクロームb 562である。また、電子伝達蛋白質として用いるシトクロームb 562としてはAcinetobacter calcoaceticus、Klebsiella pneumoniae、またはその他の細菌に由来するシトクロームb 562も利用できる。さらに好ましくは該シトクロームb 562は、大腸菌により組換え生産された蛋白質である。

電子伝達蛋白質を酸化還元酵素とともに電極上に固定化することにより、酸化還元酵素から電極への、あるいは電子メディエーターへの電子伝達を促進することができ、このことにより応答電流値の高い酵素電極を得ることができる。図1に、本発明の1つの態様である、PQQグルコース脱水素酵素、シトクロームb 562および電子メディエータを用いた系における電子伝達を示す。

特に好ましくは、本発明の酵素電極は以下の酸化還元酵素と電子伝達蛋白質の組み合わせから選択される：グルコース酸化酵素とシトクロームb 562、コレステロール酸化酵素とシトクロームb 562、乳酸酸化酵素とシトクロームb 5

62、フルクトシルアミン酸化酵素とシトクロームb562、グルコース脱水素酵素とシトクロームb562、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (PQQGDH) とシトクロームb562、フラビンを補酵素とするグルコース脱水素酵素とシトクロームb562。

5 本発明の酵素電極は、これらの酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とを電極表面上に固定化することにより製造することができる。好ましくは、これらの酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とは化学的に架橋された状態で電極上に装着される。架橋は、例えばグルタルアルデヒドを用いて行うことができる。

また、本発明の特に好ましい態様においては、本発明の酵素電極は、電子メデイエーターを含まない系においても、高い応答電流値を与えることができる。

10 別の観点においては、本発明は、作用極として上述の本発明の酵素電極を用いることを特徴とするセンサーを提供する。

本明細書において用いる場合、センサーとは、目的とする被検物質の濃度を電気化学的に測定する測定系をいい、通常は、作用極 (酵素電極) 、対極 (白金等) 、および参照極 (Ag/AgCl) 等の3電極を含む。あるいは、通常の簡易血糖値システムに多様されている作用極と対極とから構成される2電極系でもよい。センサーはさらに、緩衝液および被検試料を入れる恒温セル、作用極に電圧を印加する電源、電流計、記録計等を含む。センサーは、バッチ型であってもフロー型であってもよい。このような、酵素センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えば *Biosensors -Fundamental and Applications-* Anthony P. F. Tuner, Isao Karube and Geroge S. Wilson, Oxford University Press 1987 に記載されている。

20 好ましくは、本発明のセンサーはさらに電子メディエーターを含む。電子メデイエーターとは、本発明の酸化還元酵素から電極への電子伝達を媒介しうる非蛋白質性の金属錯体、有機化合物などの酸化還元物質をいい、例えば、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェート、フェロセンおよびこれらの誘導体が挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、PQQグルコース脱水素酵素、シトクロームb562および電子メディエータを用いた系における電子伝達を示す。

図2は、PQQグルコース脱水素酵素とシトクロームCを架橋固定化し、電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサー(A)と、PQQグルコース脱水素酵素を単独で固定化し電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサー(b)のグルコース試料注入への応答を示す。

図3は、PQQグルコース脱水素酵素とシトクロームCを架橋固定化し電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサー(A)と、PQQグルコース脱水素酵素を単独で固定化し電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサー(b)のグルコース試料注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。

図4は、PQQグルコース脱水素酵素とシトクロームb562を架橋固定化し電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサーと、PQQグルコース脱水素酵素を単独で固定化し電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサーのグルコース試料注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。図中、GB25U+100cyt b-562は、PQQGDH25 Uに対して10倍量のモル数のcytb562を固定化してある電極、GB25U+1cyt b-562は、PQQGDH25 Uに対して1倍量のモル数のcytb562を固定化してある電極、100cyt b-562は、上記GB25U+100cyt b-562 cytb562と同量cytb562だけが固定化してある電極、GB25U onlyは、PQQGDHが25 Uだけ固定されている電極を示す。

図5は、PQQグルコース脱水素酵素とシトクロームb562を架橋固定化し、電子メディエータを添加しないで作成したセンサーの、グルコース試料注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。図中、GB25U+100cyt b-562は、PQQGDH25 Uに対して100倍量のモル数のcytb562を固定化してある電極、GB25U+1cyt b-562は、PQQGDH25 Uに対して1倍量のモル数のcytb562を固定化してある電極を示す。

図6は、グルコース酸化酵素とシトクロームb562を架橋固定化し、電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサーの、グルコース試料

注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。

図7は、グルコース酸化酵素とシトクロームb562を架橋固定化し、電子メディエータを添加しないで作成したセンサーの、グルコース試料注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。

5 図8は、コレステロール酸化酵素とシトクロームb562を架橋固定化し、電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサーの、コレステロール試料注入への応答電流値のコレステロール濃度依存性を示す。

図9は、フルクトシルアミン酸化酵素とシトクロームb562を架橋固定化し、電子メディエータを添加しないで作成したセンサーの、フルクトシルバリン試料注入への応答電流値のフルクトシルバリン濃度依存性を示す。

10 図10は、種々の通性嫌気性腸内細菌のゲノム中の、E. coli B 由来 cyt.b562と相同性を示す配列の同一性および類似性を示す。

図11は、種々の通性嫌気性腸内細菌のゲノム中の、E. coli B 由来 cyt.b562と相同性を示す領域のアミノ酸配列を示す。

15 図12は、E. coli B 由来 cyt.b562とK. pneumoniae 由来 cytb562のアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子の配列を示す。枠で囲まれているアミノ酸残基はヘム鉄に配位する保存アミノ酸である。

図13は、PQQGDHの存在下においてグルコースを添加したときのK. pneumoniae 由来シトクロームb562の還元を示す。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明の酵素電極は、その表面に酸化還元酵素および電子伝達蛋白質が固定化されていることを特徴とする。本発明の酵素電極は、酸化還元酵素が単独で固定化されている酵素電極よりも高い応答性を示す。

25 本発明において用いることができる酸化還元酵素の例としては、グルコース酸化酵素、コレステロール酸化酵素、乳酸酸化酵素、アルコール酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ビリルビン酸酸化酵素、フルクトシルアミン酸化酵素、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコース-3-脱水素酵素が挙げられる。特に好ましくは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素

酵素（本明細書において「PQQGDH」と称する）である。PQQGDHは、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する酵素であり、グルコースセンサーの素子として用いることができる。PQQGDHは、*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており（*Biosci. Biotech. Biochem.* 5 (1995), 59 (8), 1548-1555）、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている（*Mol. Gen. Genet.* (1989), 217: 430-436）。

本発明の酵素電極においては、好ましくは水溶性PQQGDH、特に好ましくは*Acinetobacter calcoaceticus*由来の水溶性PQQGDHを用いる。これは同細菌から単離精製した酵素でもよく、あるいはKoji Sode, et al., *Enz. Microbiol. Technol.*, 26, 491-496 (2000) に示されるように大腸菌などで組換え生産された酵素でもよい。あるいはWO 00/61730に示されているような耐熱性が向上した改良型PQQGDHあるいはWO 00/66744に示されているような基質特異性が向上した改変型PQQGDHでもよい。

本発明において用いられる酸化還元酵素は、天然の酸化還元酵素の構造の一部が化学的に改変されている改変型酸化還元酵素であってもよい。このような改変が、例えば、酵素蛋白質の1またはそれ以上のアミノ酸残基を他の天然の型酵素は、または天然に存在しないアミノ酸残基で置換することにより、あるいは1またはそれ以上のアミノ酸を欠失させるかまたは付加することにより製造することができる。

本発明に用いる電子伝達蛋白質の例としてはシトクロームCが挙げられる。シトクロームCとしては特に由来は限定されないが、たとえばシグマ社から販売されている馬心臓由来シトクロームCを用いることができる。また同様に電子伝達蛋白質としてシトクロームb562を用いることができる。シトクロームb562としては由来は限定されないが、たとえば大腸菌由来シトクロームb562を用いることができる。大腸菌由来シトクロームb562は大腸菌を培養し、その細胞破碎液から精製し、調製してもよい。大腸菌からシトクロームb562

を調製する方法は、例えば、E. Itagaki and L. P. Hager, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 1012-1019(1968)、F. Lederer et al., *J. Mol. Biol.*, 148, 427-448(1981)に記載されている。また、大腸菌由来シトクロームb562はペリプトラズムに分泌される蛋白質であるため、細胞外膜を浸透圧ショックなどの方法により破壊することにより、シトクロームb562を精製し、調製してもよい。

あるいは大腸菌B株由来シトクロームb562の構造遺伝子を大腸菌ゲノムから単離し、これを大腸菌で機能するpTrc99Aのような発現ベクターに挿入し、組換え大腸菌を作成した後、組換え大腸菌を培養し、その細胞破碎液からシトクロームb562を精製し、調製してもよい。大腸菌B株由来シトクロームb562の遺伝子配列は、*Eur. J. Biochem.* 202 (2), 309-313 (1991)に記載されている。

また、*E. coli* K株からB株由来シトクロームb562と類似する遺伝子がクローニングされている (Tower, M.K., *Biochem. Biophys. Acta.* 1143, 109-111 (1993))。この遺伝子は不活性であり、B株由来のシトクロームb562と比べ、N末端の7残基が欠失しており、かつシトクロームb562蛋白質中に3箇所の変異がある (Ile40Val, Ala123Ser, Gln126Lys; ただし、B株由来b562のN末端のMetを1として表す)。*E. coli* K株由来のシトクロームb562の成熟蛋白質 (配列番号6のA1a24からArg129)をコードする遺伝子の成熟蛋白質 (配列番号8のA1a24からArg129)をコードする領域を大腸菌で機能する分泌発現ベクターに挿入して組換え大腸菌を作成し、この大腸菌からシトクロームb562を調製してもよい。または、*E. coli* B株由来のシトクロームb562遺伝子の成熟蛋白質 (配列番号8のA1a24からArg129)をコードする領域を大腸菌で機能する分泌発現ベクターに挿入して組換え大腸菌を作成し、この大腸菌からシトクロームb562遺伝子の一部とK株由来のシトクロームb562遺伝子の一部とを連結させ、これを大腸菌で機能するpTrc99Aのような発現ベクターに挿入し、組換え大腸菌を作成した後、組換え大腸菌を培養し、その細胞破碎液からキメラシトクロームb562を調製してもよい。さらに、*S. typhi*、*S. typhinulium*、*K. pneumoniae*、*Y. pestis*、*P. multocida*、*S. pneumoniae*等の細菌に由来するシトクロームb562を用いてもよい。

また、本発明において用いられる電子伝達蛋白質は、天然の蛋白質の構造の一部が化学的に改変されている改変型電子伝達蛋白質であってもよい。このような改変型蛋白質は、例えば、蛋白質の1またはそれ以上のアミノ酸残基を他の天然のまたは天然に存在しないアミノ酸残基で置換することにより、あるいは1またはそれ以上のアミノ酸を欠失させるかまたは付加することにより製造することができる。
5

本発明の酵素電極に用いる電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用いることができる。特に好ましいものはカーボンペースト電極である。

本発明の酵素電極を製造するためには、酸化還元酵素と電子伝達蛋白質を混合して混合蛋白質を調製する。この混合蛋白質は、酵素電極において被検物質（例えばグルコース）の存在を認識し、その酸化還元反応を触媒し、その結果生じる電子を電極に伝達するよう作用する。酸化還元酵素と電子伝達蛋白質との混合比は一般にはモル比で、1:1～1:10000、好ましくは1:10～1:50である。得られた混合蛋白質は、00、さらに好ましくは1:50～1:1000である。得られた混合蛋白質は、そのままカーボンペーストなどの電極材料と混合して電極に装着することができる。
10

あるいは一般的な酵素固定化方法を用いて固定化酵素を調製したあとに電極上に装着してもよい。例えば、両者を混合した後にグルタルアルデヒドなどの二架に架橋して、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどの合成ポリマーあるいは天然高分子マトリックス中に包括固定する方法が
15

あげられる。このようにして調製した混合蛋白質をカーボンペーストと混合あるいはカーボンペーストと混合した後にさらに架橋処理することにより調製した混合物をカーボンあるいは金、あるいは白金などで構成される電極上に装着する。

さらにこのようにして電極上に複合蛋白質を装着するときに同時に電子メディエーターを固定することも可能である。典型的には、PQQGDHとシトクロームCまたはシトクロームb562とを混合し、これをさらにカーボンペーストと
20

混合した後に凍結乾燥する。これをカーボン電極上に装着し、その状態でグルタルアルデヒド水溶液に浸し、複合蛋白質を架橋し、酵素電極を作成する。
25

本発明のセンサーは、作用極として上述の酵素電極を有することを特徴とする。対極としては例えば白金電極を、参照電極としては例えばAg/AgCl電極を

用いることができる。本発明のセンサーは、さらに電子メディエーターを含むことができる。電子メディエーターとしては、特に限定されないが、例えばフェリシアノ化カリウム、フェナジンメトサルフェート、フェロセンおよびその誘導体シアン化カリウムなどを用いることができる。好ましくはフェリシアノ化カリウムを用いる。

5 被検試料、例えばグルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、電子メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアノ化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極としてPQQGDHとシトクロームCあるいはシトクロームb562を固定化した酵素電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。作用極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、恒温セルにグルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

10 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2001-70421号および2001-281985号の明細書に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

20 実施例

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 組換えシトクロームb562の調製

25 Nikkila,H., Gennis,R.B. and Sligar,S.G., *Eur. J. Biochem.* 202 (2), 309-313 (1991)及びTower,M.K., *Biochem. Biophys. Acta.* 1143, 109-111 (1993)にしたがい、以下の2組のオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、それぞれを用いて大腸菌、Escherichia coli DH5 α 株 (E.coli K株) およびEscherichia coli B株のゲノムに対してPCR法によりシトクロームb562の構造遺伝子領域を増幅した。それぞれの大腸菌からのゲノムDNAの抽出方法は常法に従った。PCR

プライマーとして、フォワード側に制限酵素 Nco I により認識される配列およびシトクローム b 5 6 2 の分泌のための E.coli B 株由来のシグナル配列の領域を增幅あるいは付加させる配列を含むプライマー(B CybC Fw NcoI)と含まないプライマー(CybC Fw w/o SP)をデザインし、リバース側に制限酵素 Bam HI により認識される配列を含むプライマー(B CybC Rev Bam HI, K Cyb Rev Bam HI)をデザインした。

5 B CybC Fw NcoI:
 5'-GGGGGCCATGGGGCGTAAAAGCCTGTTAGCTATTCTGCAGTCTCC-3'
 (配列番号 1)

10 B CybC Rev Bam HI:
 5'-GGGGGGGATCCTAACGATACTTCTGGTGATAGCGTTGCGGG-3'
 (配列番号 2)

CybC Fw w/o SP:
 5'-GGGGGCCATGGCCGCTGATCCTGAAGACAATATGGAAACCC-3' (配列番号 3)

K CybC Rev Bam HI:
 5'-GGGGGGGATCCTAACGATACTTCTTGATATGAATTGCG-3' (配列番号 4)

15 E.coliDH5 α 株に対しては B CybC Fw NcoI— K Cyb Rev Bam HI あるいは E.coli B CybC Fw w/o SP— K CybC Rev Bam HI のプライマーの組み合わせ、E.coli B 株に対しては B CybC Fw NcoI— B CybC Rev Bam HI あるいは CybC Fw w/o SP— B CybC Rev Bam HI のプライマーの組み合わせで PCR をを行い、それぞれの対応する遺伝子領域を增幅した。

20 それぞれの增幅遺伝子断片を大腸菌での発現ベクターである pTrc99A の NcoI-Bam HI サイトに挿入し、シトクローム b 5 6 2 発現用ベクターとしてそれぞれ、pTrc99A-KcybC と pTrc99A-KcybC w/o SP および pTrc99A-BcybC と pTrc99A-BcybC w/o SP を構築した。これらを E.coli DH5 α 株に形質転換し、シトクローム b 5 6 2 を生産する組換え大腸菌を作成した。

25 なお、クローニング及び発現に用いた E.coli B 株のシトクローム b 5 6 2 の

構造遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号 5 及び 6 に、またクローニング及び発現に用いた *E.coli* K 株のシトクローム b 5 6 2 の構造遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号 7 及び 8 に示す。

5 このようにして作成した組換え大腸菌を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む L 培地にて 37 °C で振とう培養し、集菌後、超音波破碎により細胞抽出液を得た。その結果、いずれの発現ベクターが形質転換されている組換え大腸菌においてもシトクローム b 5 6 2 由来の赤色が確認されシトクローム b 5 6 2 が水溶性蛋白質として生産されていることが明らかとなった。

10 この中で生産性の高かった形質転換体は発現ベクターとしてシグナル配列を含むシトクローム b 5 6 2 遺伝子が挿入された pTrc99A-KcybC と pTrc99A-BcybC が形質転換された株であり、いずれも大腸菌で発現され、ペリプラズムに大量に *E.coli* K 株および B 株由来のシトクローム b 5 6 2 が生産された。これらの組換え大腸菌を用いて、酵素電極作成に用いるシトクローム b 5 6 2 の調製を行った。

15 pTrc99A-BcybC あるいは pTrc99A-KcybC が形質転換された *E.coli* DH5 α 株を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む 2 リットルの L 培地にて 37 °C で発酵槽にて培養した。対数増殖期にさしかかったところで、組換え遺伝子の誘導発現を行うために IPTG を 300 μ M 添加し、さらに、定常期にさしかかるまで培養を行った。集菌後、超音波破碎機により破碎し、細胞抽出液を得た。これを pH 7.2 の 10 mM MOPS 緩衝液で透析脱塩ののち、DEAE-Toyopearl による陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られた蛋白質は SDS PAGE により分子量 12.3kDa であることが確認され、また、スペクトル解析からシトクローム b 5 6 2 の特徴的な 562nm における還元スペクトルが観察され、精製したシトクローム b 5 6 2 が調製された。

20 実施例 2 PQQGDH とシトクローム C が固定化された酵素電極の作成

常法により精製した *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH 酵素溶液(3900 U·mg⁻¹protein)に PQQ 1 μ M、CaCl₂ 1mM となるように加え、30 分暗所室温でインキュベートした。これを、100 倍量の 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で 1 晩透析した。シグマ社 (No. C-7752) から購入

した馬心臓由来シトクローム C (以下 cyt.c と表記することもある) を 1mM となるように 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)に溶解し、100 倍量の 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で一晩透析したものを調製した。

5 このようにして調製した PQQGDH(25unit,0.64x10⁻¹⁰mol)、cyt.c サンプル (酵素の 100 倍モル量、0.64x10⁻⁸mol)を同時にカーボンペースト 20mg と混合し凍結乾燥した。これをよく混合した後、すでにカーボンペーストが約 40mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。

10 この電極 (酵素電極) を、1%のグルタルアルデヒドを含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)中で 30 分室温で攪拌し、さらに 10mM Tris 緩衝液 (pH7.0)中で 20 分室温で攪拌した。この電極は 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)中で 1 時間以上室温で攪拌し、平衡化した。

実施例 3 PQQGDHとシトクローム C(cyt.c)と電子メディエーターとしてのフェリシアン化カリウムから構成されるセンサーを用いるグルコースの計測

15 恒温セルに 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)を入れ、メディエーターとして、終濃度 10mM フェリシアン化カリウムを加え、総量を 10ml とした。そこに作用電極として実施例 2 で作成した PQQGDH およびシトクローム C が固定されているカーボンペースト電極 (酵素電極) 、対極として白金電極、参照極として Ag/AgCl 電極を挿入し、センサーを作成した。

20 測定は全て 25℃で行った。印加電位+400mV vs Ag/AgCl の電位を印加した。電流が定常になったところで、適当な濃度のグルコースを加えて増加した電流値を計測した。グルコースを加えていないときの電流値を 0A とした。

25 PQQGDH 単独を固定してある酵素電極、PQQGDH とそのモル数の 100 倍量の cyt.c を固定してある酵素電極を用い、フェリシアン化カリウムを電子メディエーターとしたときのグルコース試料注入に対する応答を図 2 に示す。このように、PQQGDH とそのモル数の 100 倍量の cyt.c を固定している酵素電極のほうがはるかに大きな応答を示し、感度が高いことが示された。

図 3 には PQQGDH 単独を固定してある酵素電極、PQQGDH とそのモル数の 100 倍量の cyt.c を固定してある酵素電極を用い、フェリシアン化カリウムを電子メディエーターとしたときのキャリプレーションカーブを示した。それぞ

5 れの電極のグルコース濃度 4.2mM での応答電流値を比較した。グルコース濃度 4.2mM での各電極の応答電流値は PQQGDH 単独固定化酵素電極では 0.5nA、PQQGDH とそのモル数の 100 倍量の cyt.c を固定している酵素電極では 22 nA が得られた。cyt.c を固定化することによって、PQQGDH のグルコースに 対する応答電流値が酵素単独の電極に比べ、約 40 倍になったことがわかった。

また、電極に固定化する cyt.C の量を変えて測定したところ、cyt.c の固定化量にはほぼ比例して応答電流値に増加がみられた（データ示さず）。

実施例 4 PQQGDH とシトクローム b562 が固定化された酵素電極の作成

常法により精製した *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH 酵素溶液(3900 U·mg⁻¹protein)に PQQ 1 μM、CaCl₂ 1mM となるように加え、30 分暗所室温でインキュベートした。これを、100 倍量の 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で 1 晩透析した。実施例 1 で示した方法で調製したシトクローム b562 (cyt.b562) を 1mM となるように 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) に溶解し、100 倍量の 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0) で一晩透析したもの を調製した。

このようにして調製した PQQGDH(25unit, 0.64x10⁻¹⁰mol)、cyt.b562 サンプル(酵素の 100 倍モル量、0.64x10⁻⁸mol)を同時にカーボンペースト 20mg と混合し凍結乾燥した。これをよく混合した後、すでにカーボンペーストが約 40mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。

20 この電極（酵素電極）を、1% のグルタルアルデヒドを含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0) 中で 30 分室温で攪拌し、さらに 10mM Tris 緩衝液 (pH7.0) 中で、20 分室温で攪拌した。この電極は 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0) 中で 1 時間以上 室温で攪拌し、平衡化した。

実施例 5 PQQGDH とシトクローム b562 と電子メディエーターとしての フェリシアン化カリウムから構成されるセンサーを用いるグルコースの計測

恒温セルに 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)を入れ、メディエーターとして、終濃度 10mM フェリシアン化カリウムを加え、総量を 10ml とした。そこに作用電極として実施例 4 で作成した PQQGDH および cyt.b562 が固定されているカーボンペースト電極（酵素電極）、対極として白

金電極、参照極として Ag/AgCl 電極を挿入し、センサーを作成した。

測定は全て 25°C で行った。印加電位 +400mV vs Ag/AgCl の電位を印加した。電流が定常になったところで、適当な濃度のグルコースを加えて増加した電流値を計測した。グルコースを加えていないときの電流値を 0A とした。

5 PQQQGDH 単独が固定されている酵素電極、固定されている PQQQGDH に対して当モル数の cyt.b562 が固定されている酵素電極、固定されている PQQQGDH に対して 100 倍量のモル数の cyt.b562 が固定されている酵素電極、また前述と同量の cyt.b562 が固定されていて PQQQGDH を含まない電極について、それぞれの応答電流値のグルコース濃度依存性を図 4 に示した。それぞれの電極のグルコース濃度 5.0 mM での応答電流値を比較した。グルコース濃度 5.0 mM での各電極の応答電流値は、PQQGDH 単独固定化酵素電極は 1.0 nA 以下、cyt.b562 単独固定化電極が 0nA、固定されている PQQQGDH に対して当モル数の cyt.b562 が固定されている酵素電極では 5 nA、固定されている PQQQGDH に対して当モル数の cyt.b562 が固定されている酵素電極では 65 nA が得られた。cyt.b562 を固定化することによって、PQQGDH のグルコースに対する応答電流値が、PQQGDH 単独で固定化されている電極に比べ、約 60 倍以上になったことがわかった。

実施例 6 PQQQGDH とシトクローム b 562 が固定化された酵素電極の作成

実施例 4 と同様にして調製した PQQQGDH (25unit, 0.64×10^{-10} mol)、
20 cyt.b562 サンプル (酵素の 100 倍モル量、 0.64×10^{-8} mol) を同時にカーボンペースト 20mg と混合し凍結乾燥した。これをよく混合した後、すでにカーボンペーストが約 40mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。

この電極を、1% のグルタルアルデヒドを含む 10mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で 30 分室温で攪拌し、さらに 10mM Tris 緩衝液 (pH 7.0) 中で 20 分室温で攪拌した。この電極 (酵素電極) は 10mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で 1 時間以上室温で攪拌し、平衡化した。

実施例 7 PQQQGDH とシトクローム b 562 が固定化された酵素電極を用いるグルコースの計測

恒温セルに 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)を入れ、メティエーターを添加せずに総量を 10ml とした。そこに作用電極として実施例 6 で作成した PQQGDH および cyt.b562 が固定されているカーボンペースト電極 (酵素電極)、対極として白金電極、参照極として Ag/AgCl 電極を挿入し、センサーを作成した。

測定は全て 25°C で行った。印加電位 +400mV vs Ag/AgCl の電位を印加した。電流が定常になったところで、適当な濃度のグルコースを加えて増加した電流値を計測した。グルコースを加えていないときの電流値を 0A とした。

固定されている PQQGDH と当モル量の cyt.b562 が固定されている酵素電極、固定されている PQQGDH と 100 倍量の cyt.b562 が固定されている酵素電極のキャリブレーションカーブを図 5 に示した。それぞれの電極のグルコース濃度 5.0 mM での応答電流値を比較した。グルコース濃度 10 mM での各電極の応答電流値は、固定されている PQQGDH と当モル量の cyt.b562 が固定されている酵素電極では 0nA、固定されている PQQGDH と 100 倍量の cyt.b562 が固定されている酵素電極では 30 nA が得られた。すなわち、PQQGDH と cyt.b562 を固定化した電極を用いることにより、センサーに電子メティエーターを添加しない条件でもグルコースが計測できることが示された。

実施例 8 グルコースオキシダーゼ (GOD) および組換え cyt.b562 が固定化されている酵素電極およびメティエーターを用いるセンサー

Aspergillus niger 由来のグルコースオキシダーゼ (101U/mg protein) 5 ユニットと E.coli によって組換え生産した Cytb562 4.3 x 10⁻⁸ mol (GOD に対して 100 倍モル量に相当する、0.6 mg) とカーボンペースト 20 mg とを混合して 100 倍モル量に相当する、0.6 mg) とカーボンペースト 20 mg とを混合し、凍結乾燥した後にカーボンペースト電極に装着した。この電極を 1% グルタルアルデヒド水溶液中で 30 分間放置し、蛋白質同士を架橋した。このようにして作成した酵素電極を作用極とし、参照極に Ag/AgCl、対極に Pt 電極を用いた。この電極を 10 mM フェリシアン化カリウムをメティエーターとして含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 に浸漬し、25°C でバッテ方式でグルコース添加に伴う応答電流値を測定した。印加電位は +400mV vs Ag/AgCl とした。比較対照として、Cytb562 を含まない GOD 固定化電極を同一の方法で作成し、グル

コース添加に伴う応答を測定した。

結果を図6に示す。Cytb562を混合しない比較対照の電極においてもグルコース添加により応答電流値の増加がみられる（内側のグラフ；黒丸）。しかし、本システムでの計測においてはその応答値はグルコース10mMにおいて3nA程度である。これに対して、Cytb562を混合したGOD電極においては良好な応答性を示し、グルコース10mMにおいては60nA以上とCytb562なしの場合の20倍以上の応答を示した。

実施例9 グルコースオキシダーゼ（GOD）およびcyt.b562が固定化されている酵素電極を用いる直接電子移動型センサー

10 Aspergillus niger由来のグルコースオキシダーゼ（6.9U/mg protein）5ユニットとE.coliによって組換え生産したCytb562 4.3×10^{-8} mol（GODに対して100倍モル量に相当する、0.6mg）とカーボンペースト20mgとを混合し、凍結乾燥した後にカーボンペースト電極に装着した。この電極を1%グルタルアルデヒド水溶液中で30分間放置し、蛋白質同士を架橋した。このようにして作成した酵素電極を作用極とし、参照極にAg/AgCl、対極にPt電極を用いた。この電極を10mMリン酸カリウム緩衝液pH7.0に浸漬し、最クリックボルタもグラム（CV）を25°Cで観測した。掃印速度は50mV/secとし、-300mVから+300mVの範囲で電位を掃印した。さらにこの時バッチ方式で20mMグルコース添加に伴うCVの変化を測定した。

15 本実験の結果、電位+300mV（vs Ag/AgCl）付近における電流値がグルコース添加によって明らかに増加していた。このような応答はGODを単独で固定化した系では観測されない。このことから、GODとともにCytb562を固定化した酵素電極を用いて、人工電子メディエーターを介さない直接電子移動型のセンサーを構築できることが明らかとなった。

20 さらに電位を+250mV（vs Ag/AgClとして）と固定したときの、本電極のグルコースに対するキャリプレーションカーブを図7に示す。それぞれの電極のグルコース濃度5.0mMでの応答電流値を比較したところ、GOD単独が固定された電極は応答電流値が観測されなかったが、b562とともに固定した電極においては、グルコース濃度に依存した応答電流値が観測された。すなわち、

25

GOD と cyt.b562 を固定化した電極を用いることにより、センサーに電子メディエーターを添加しない条件でもグルコースが計測できることが示された。

実施例 10 コレステロールオキシダーゼ (COD) および cyt.b562 が固定化されている酵素電極およびメディエーターを用いるセンサー

5 コレステロールオキシダーゼ(COD; 12.77U/mg protein)1.5 ユニット(5.26 x 10-10 mol)と E.coli によって組換え生産した Cytb562 5.26 x 10-8 mol (COD に対して 100 倍モル量に相当する、0.789 mg)とカーボンペースト 20 mg とを混合し、凍結乾燥した後にカーボンペースト電極に装着した。この電極を 1 % グルタルアルデヒド水溶液中で 30 分間放置し、蛋白質同士を架橋した。このよう 10 にして作成した酵素電極を作作用極とし、参照極に Ag/AgCl、対極に Pt 電極を用いた。この電極を 10 mM フェリシアン化カリウムをメディエーターとして含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 に浸漬し、25 °C でバッチ方式でコレステロール添加に伴う応答電流値を測定した。印加電位は +400mV vs Ag/AgCl とした。比較対照として、Cytb562 を含まない COD 固定化電極を同一の方法で 15 作成し、コレステロール添加に伴う応答を測定した。コレステロール溶液は 5.0 mg の Triton X100 と 500 mg のコレステロールとを混合、加熱融解後 90 ml の蒸留水を添加し煮沸冷却後、4.0g のコール酸ナトリウム塩を添加し溶解させた後、蒸留水を加え全量 100 ml としたものを標準溶液として調製した。

結果を図 8 に示す。Cytb562 を混合しない比較対照の電極においてもコレ 20 テロール添加により応答電流値の増加がみられる（内側のグラフ；白丸）。しかし、本システムでの計測においてはその応答値はコレステロール濃度 0.02mM で約 1 nA 程度であり、またこれ以上の濃度においてもほぼ応答は飽和していた。これに対して、Cytb562 を混合した COD 電極においては良好な応答性を示し、コレステロール 0.02mM においては 2 nA 以上と Cytb562 なしの場合の 2 倍以上の応答を示した。さらに高濃度のコレステロールに対しても応答は飽和せず、25 0.5mM 以上の濃度測定も可能であった。その時の応答値は 20 nA 以上と Cytb562 を用いない電極の応答値の最大値の 20 倍近い値となった。

実施例 11 フルクトシルアミン酸化酵素 (FAOD) およびシトクローム b562 が固定化されている酵素電極およびメディエーターを用いるセンサー

Pichia sp. N1-1 株由来のフルクトシルアミン酸化酵素（特開 2000-270855）を用いた。フルクトシルアミン酸化酵素を 10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)中で 1 晩透析した。FAOD の活性測定は、25°Cにおいて、15mM 4-アミノアンチピリン、20mM フエノール、20U/ml ペルオキシダーゼ、1M フルクトシルバリンをそれぞれ 20 μl 添加し、500nm の吸光度の変化を分光光度計を用いて測定した。このとき 1 分間に 1 μmol の H₂O₂ が生成される酵素活性を 1U とし、モル吸光係数は 12880mM⁻¹ とした。

FAOD(0.4unit, 5.08x10⁻⁹mol)、FAOD および酵素の 20 倍モル量の 10 cyt_{b562}(1.01x10⁻⁷mol)、または FAOD および cyt_{b562} および同タンパク量の BSA を用いて、実施例 2 と同様に FAOD が固定化された酵素電極を作成した。恒温セルに 10mM リン酸緩衝液(pH7.0)を入れ、メティエーターとして、終濃度 1mM m-PMS を加え、総量を 10ml とし、アルゴンを通気した。作用電極として作製したカーボンペースト電極を用い、対極として白金電極、参照極として Ag/AgCl 電極を用いた。測定は全て 25°C、印加電位+100mV vs Ag/AgCl で行った。電流が定常になったところで、適当な濃度のフルクトシルバリン溶液を加えて増加した電流値を計測した。フルクトシルバリンを加えていないときの電流値を 0A とした。各電極のキャリブレーションカーブを図 9 に示す。FAOD を cyt_{b562} とともに固定化した場合、フルクトシルバリンに対する応答電流値は、20 FAOD のみ、FAOD+100BSA の電極に比べ、約 4 倍高かった。なお、m-PMS を含まない系においてはいずれの電極でもフルクトシルバリンに対する応答は得られなかった。

実施例 12 cyt_{b562}類似蛋白質のデータベース検索

ゲノム情報が公開されているさまざまな生物由来のアミノ酸配列に対して 25 E.coliB 由来水溶性 cyt_{b562}とのホモロジー検索を行った（図 10）。E.coli の他株のほかに *Salmonella typhi* CL18 と *Yersinia pestis* CO92 にも水溶性 cyt_{b562} と高い相同性を示す配列が見られた。Y.pestis はグラム陰性細菌であり、ペストの病原菌である。またグラム陰性短桿菌で、家畜の出血性敗血症などの感染症の原因菌として知られている *Pasteurella multocida* PM70 にも相同性を示す配列

が得られた。*Streptococcus pneumoniae* R6 の PspA タンパク質 619 残基中の 210~280 残基に低い相同性領域を確認した。Pneumococcal surface protein A(PspA)タンパク質は脳炎などの感染症の原因である *S.pneumoniae* の幼児用の免疫として考えられているタンパク質であり、この 619 残基中の前半部の α -ヘリックス領域と相同性が存在した。

また、これらのアミノ酸ホモロジー検索の結果をもとにポリペプチド間での保存残基を検索した。この結果、ヘム鉄と配位する N 末端側の Met7、C 末端側の His102 が保存され、配列全体では C 末端領域が保存されていることがわかった(図 1 1)。この結果をもとに *cytb*₅₆₂ の立体構造上で保存されている残基を三次元で表示させると、4 番目の α -ヘリックスに保存されたアミノ酸残基が多く存在することと、ヘム鉄と接近する 61・65 番目(シグナル配列を除く)の Phe 残基や 105 番目の Tyr 残基、ヘム鉄と配位する 102 番目の His 残基を含む芳香族環を持つ残基の保存も確認できた。この結果は *cytb*₅₆₂ と構造が類似している *cytc'* のヘム近傍に位置する芳香族アミノ酸(82Phe,86Trp,125Phe)が保存されている報告と一致する (PC Weber, FR Salemme (1981) J.Biol.Chem. 256, 7702-7704)。 *cytc'* は *cytb*₅₆₂ と同様に 4- α -ヘリックスバンドルを形成し、この立体構造が同じ領域のアミノ酸残基の相同性は、17%と低い。しかし、両タンパク質の構造解析から *cytc'*・*cytb*₅₆₂ のヘム鉄と配位する 102His(*cytb*₅₆₂) 122His(*cytc'*)の立体的な位置が一致することと、ヘム近傍の対応する位置にある芳香族アミノ酸(*cytb*₅₆₂:61Phe,65Phe,105Tyr)(*cytc'*:82Phe,86Trp,125Phe)の残基とヘムとの配位類似性があることが示された (PC Weber, FR Salemme (1981) J.Biol.Chem. 256, 7702-7704; Hamada K, PH Bethget and FS Mathews (1995) J.Mol.Biol. 247 947-962; PD Barker and AR Fersht (1999) Biochemistry 38, 8657-8670)。 *cytb*₅₆₂ のヘムは内部の疎水残基のポケットに位置し、プロトヘムとその側鎖のプロピオニ酸が溶媒に露出した状態で 102His と 7Met に配位されている。このとき、ヘム近傍に存在する 65Phe の側鎖はプロトヘムと平行に位置し、水素結合を形成している。また、61Phe,105Tyr もプロトヘムと相互作用していることから、これらの残基がヘムの配向に重要な残基であると考えられる。また、ヘム鉄と配位する His102(*cytc'*:122)や Met7(*cytc'*:16 not coordinated)の立体的な位置は cyt の 1,4

番目のヘリックスによって決まり、とくにホロ型、アポ型における4番目の α ヘリックスの形が変化しないことと、4番目のヘリックス上にある cytc'ヘムとチオール結合する Cys118,121 の立体的な位置が cyt b₅₆₂ の 98Arg,101Tyr の立体的な位置と一致していることから、4番目の α ヘリックスの構造はタンパク質-ヘム相互作用に重要であると考えられる。これは、図11に示されるアライメントの結果より、4番目のヘリックスに対してよく保存されていたことと一致する。このような4 α ヘリックスバンドルという特徴的な構造と、ヘムとの相互作用を強めていると考えられる芳香族アミノ酸と α ヘリックス上の残基の保存によって、ヘムが特定の配向を取り、共通した配置をとると考えられる。この結果、配置されたヘムの露出が高いために、溶媒の影響(pH)を受けやすいと考えられる。

実施例13 K. pneumoniae 由来シトクロームCb562の調製

Klebsiella pneumoniae MGH78578 の公開されたゲノム情報をもとに、BLAST を用いて Escherichia coli B の水溶性シトクローム(cybC)b₅₆₂ のアミノ酸・塩基配列とのホモロジー検索を行い、相同性の高い領域を確認した。この領域を挟み、制限酵素サイト(NcoI/BamHI)を有するプライマーを設計し、これを用いて、K. pneumoniae NCTC418 ゲノムに対して PCR 増幅を行ったところ、約 400bp の増幅断片が得られた。この塩基配列は、cybC 遺伝子と比較すると、遺伝子レベルで 70%、アミノ酸レベルで 67% の相同性を有していた（図12）。

この PCR 産物の NcoI-BamHI 断片を、実施例1に記載の発現ベクター pTrc99A 中にサブクローニングし、大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。

Klebsiella pneumoniae 由来のシトクロームCb562 (KNcyt.b)をコードする遺伝子を含む大腸菌を培養した結果、赤い菌体を得た。この菌体のペリプラズム・水溶性・膜画分のスペクトルを観察したところ、両菌体のペリプラズム画分・水溶性画分にシトクロームの酸化型 (418 nm) および還元型 (428 nm, 562 nm) に特徴的なピークが認められた。

KNcyt.b の精製は以下のように行った。KNcyt.b をコードする遺伝子を含む大腸菌 DH5 α を LB 倍地, 37°C, 200rpm, 7L スケールで培養した後、7,000×g, 5min, 4°Cにて集菌、50mM p.p.b.(pH7.0)で洗浄後、-80°Cで一晩凍結した。この

菌体を 50mM p.p.b.(pH7.0)に懸濁して融解し、遠心分離(10,000×g, 20min, 4°C)し、上清に pH4~5 となるように HCl を加え、4°Cで 1 時間攪拌し、その後 pH7 となるように NaOH を加えた。超遠心分離(5,0000rpm, 60min, 4°C)を行つて上清を回収し、10mM MOPS 緩衝液(pH7.2)で一晩透析した。このサンプル 5 に対し、フェリシアン化カリウム（終濃度 10mM）を添加して、Cyt b₅₆₂ を酸化した後、PD-10 により脱塩した。このサンプルを陰イオン交換カラム(DEAE- 10 5PW, A; 10mM MOPS pH7.2, B; 300mM NaCl, 10mM MOPS pH7.2, グラジエント 80%、9 カラム容量)およびゲル濾過(Superdex200, 300mM NaCl, 10mM MOPS pH7.2,)を行つて、精製 cyt b₅₆₂ を得たのち PEG 濃縮を行つた。SDS- PAGE を行つたところ、14kDa 付近にシングルバンドが認められた。

KNcyt.b の濃度は以下のようにして求めた。300nm~600nm の酸化型スペクトルを測定し、酸化型に特徴的なピーク(418nm, 533nm)を確認した後に還元剤(ハイドロサルファイトナトリウム)を加え、還元型に特徴的なピーク(427nm, 531nm, 562nm)を測定した。還元型の $ABS_{562nm} - ABS_{578nm}$ の吸光度の 15 差スペクトルを求めて、E.coliB 由来 cyt b₅₆₂ のモル吸光係数を用いて以下の計算式：

KNcyt.b 濃度(mM) = $ABS_{562nm-578nm} \times 24.6 \times$ 希釈倍率
にしたがつて計算した。

実施例 1 4 K. pneumoniae 由来のシトクローム Cb562 の酸化還元電位

20 PQQGDH-B に、PQQ、CaCl₂ (各終濃度 1 μM・1mM) を加え、室温でホロ化 (30 分)させた後、サンプル中からの過剰な PQQ を除くため一晩透析(10mM MOPS pH7.0, 1mM CaCl₂)を行つた。これを酵素サンプルとして、0.5U の GDH-B に対して特定倍モル量の KNcyt.b を加え、グルコース(終濃度 50mM)を添加して、単位時間あたりの還元型 cyt b 値の増加を 562nm と 578nm の差スペクトルより求めた。PQQGDH - B 存在下におけるグルコース添加によって還元ピークの増加が見られた。また、PQQGDH - B の濃度(mol/l)に対する KNcyt.b の還元型の増加において濃度依存性が見られた (図 1 3)。すなわち、KNcyt.b と PQQGDH-B との間の直接電子移動が確認された。

実施例 1 5 P Q Q G D H と K. pneumoniae 由来のシトクローム Cb562 が固定

化された酵素電極およびこれを用いるグルコースの計測

PQQGDH(25unit, 0.64×10^{-10} mol)および実施例1 3で調製したKNcyt.b562サンプル(酵素の100倍モル量、 0.64×10^{-8} mol)を用いて、実施例2と同様に酵素電極を作成した。

5 恒温セルに1mM CaCl₂を含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)を入れ、メディエーターとして、終濃度10mMフェリシアン化カリウムを加え、総量を10mlとした。作用電極としてPQQGDHおよびKNcyt.bが固定されているカーボンペースト電極(酵素電極)、対極として白金電極、参照極としてAg/AgCl電極を挿入し、センサーを作成した。測定は実施例3と同様に行った。PQQGDHおよびKNcyt.bが固定化されている電極は、PQQGDHのみが固定化されている電極と比較して、グルコースに対する応答電流値が有意に高かった。

10 15

産業上の利用性

本発明の酵素電極およびこれを用いるバイオセンサーは、血糖値を測定するグルコースセンサーとして、血中のコレステロールやフルクトシルアミンの濃度を測定するセンサーとして有用である。

請求の範囲

1. 酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とを有する酵素電極。
2. 酸化還元酵素がピロロキノリンキノンを補酵素とする酸化還元酵素である、
5 請求項1記載の酵素電極。
3. 酸化還元酵素がフラビンを補酵素とする酵素である、請求項1記載の酵素
電極。
4. 酸化還元酵素が、グルコース酸化酵素、コレステロール酸化酵素、乳酸酸
化酵素、アルコール酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ビリルビン酸酸化酵素、
10 フルクトシルアミン酸化酵素、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、
グルコース-3-脱水素酵素からなる群より選択される、請求項1記載の酵素電
極。
5. 電子伝達蛋白質がシトクロームCである、請求項1記載の酵素電極。
6. 電子伝達蛋白質がシトクロームb562である、請求項1記載の酵素電極。
15 7. 電子伝達蛋白質が配列番号6のA1a24からArg129または配列番
号8のA1a24からArg129のアミノ酸配列を有する蛋白質である、請求
項1記載の酵素電極。
8. 電子伝達蛋白質がシトクロームc551である、請求項1記載の酵素電極。
9. 酸化還元酵素がグルコース酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクロー
ムb562である請求項1記載の酵素電極。
20 10. 酸化還元酵素がコレステロール酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシト
クロームb562である請求項1記載の酵素電極。
11. 酸化還元酵素が乳酸酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクロームb
562である、請求項1記載の酵素電極。
25 12. 酸化還元酵素がフルクトシルアミン酸化酵素であり、電子伝達蛋白質が
シトクロームb562である、請求項1記載の酵素電極。
13. 酸化還元酵素がグルコース脱水素酵素であり、電子伝達蛋白質がシトク
ロームb562である、請求項1記載の酵素電極。
14. 酸化還元酵素がピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素

酵素 (PQQGDH) であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b 5 6 2 である、請求項 1 記載の酵素電極。

15. 酸化還元酵素がフラビンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b 5 6 2 である、請求項 1 記載の酵素電極。

5 16. グルコース脱水素酵素とシトクローム C とが化学的に架橋された状態で電極上に装着されていることを特徴とする酵素電極。

17. グルコース脱水素酵素とシトクローム b 5 6 2 とが化学的に架橋された状態で電極上に装着されていることを特徴とする酵素電極。

18. 架橋がグルタルアルデヒドを用いて行われたものである、請求項 1 6 または 17 に記載の酵素電極。

19. シトクローム b 5 6 2 が大腸菌由来シトクローム b 5 6 2 である請求項 6、9、10、11、12、14、15、17 および 18 のいずれかに記載の酵素電極。

20. 作用極として請求項 1 ～ 19 のいずれかに記載の酵素電極を用いることを特徴とするセンサー。

21. 電子メディエーターをさらに含む、請求項 20 記載のセンサー。

22. 電子メディエーターが、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェート、フェロセンおよびその誘導体から選択される、請求項 21 記載のセンサー。

23. PQQGDH とシトクローム C とが架橋された状態で電極上に装着されており、電子メディエーターがフェリシアン化カリウムである、請求項 21 記載のセンサー。

24. PQQGDH と大腸菌シトクローム b 5 6 2 とが架橋された状態で電極上に装着されており、電子メディエーターがフェリシアン化カリウムである、請求項 21 記載のセンサー。

1 / 1 1

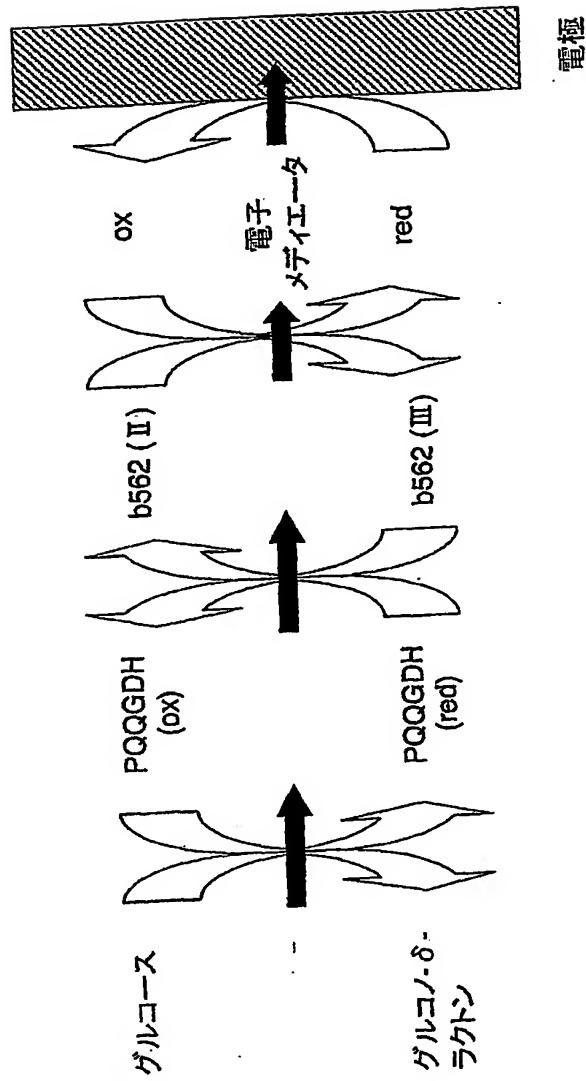


図 1

2 / 1 1

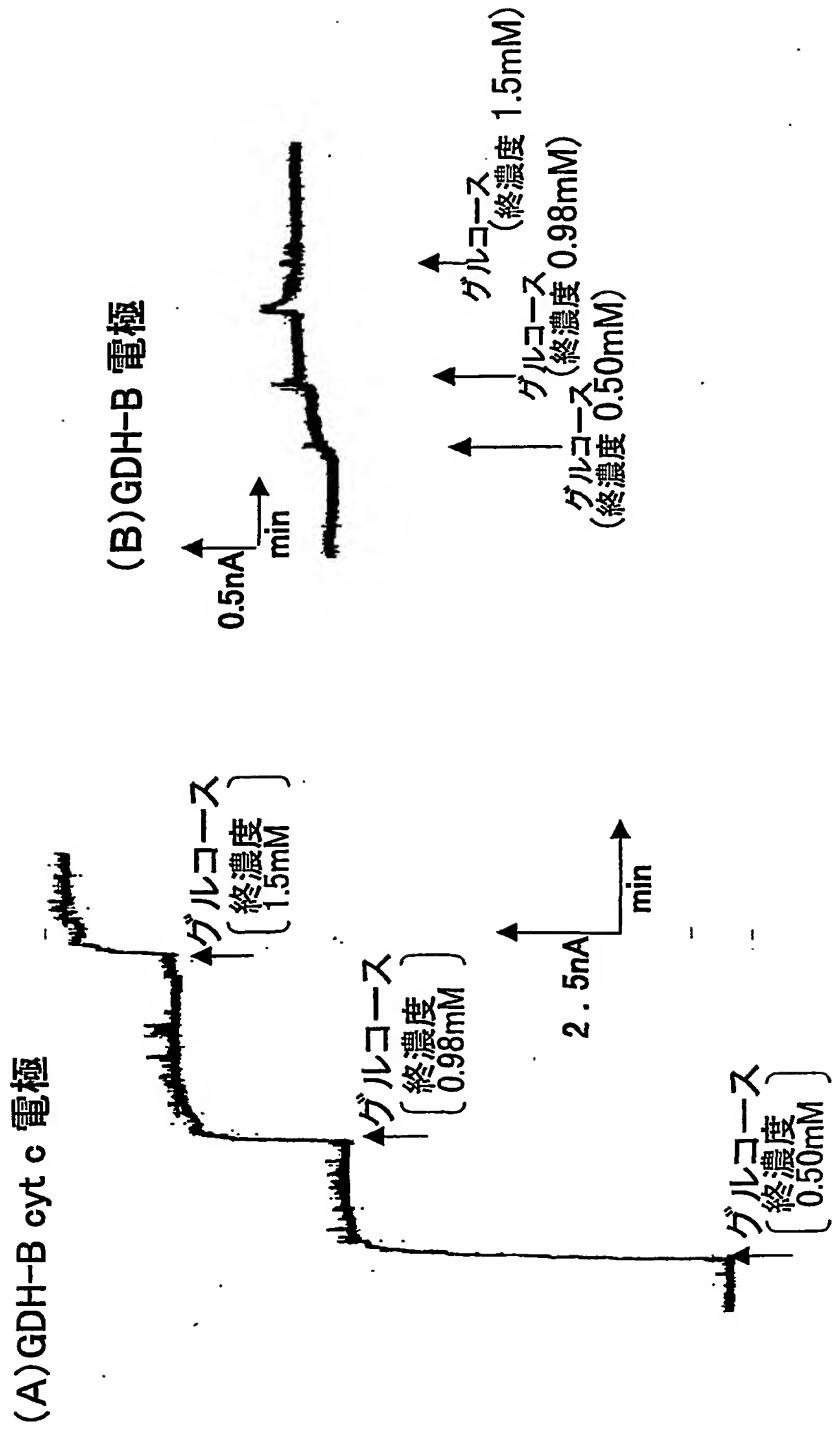


図 2

3 / 11

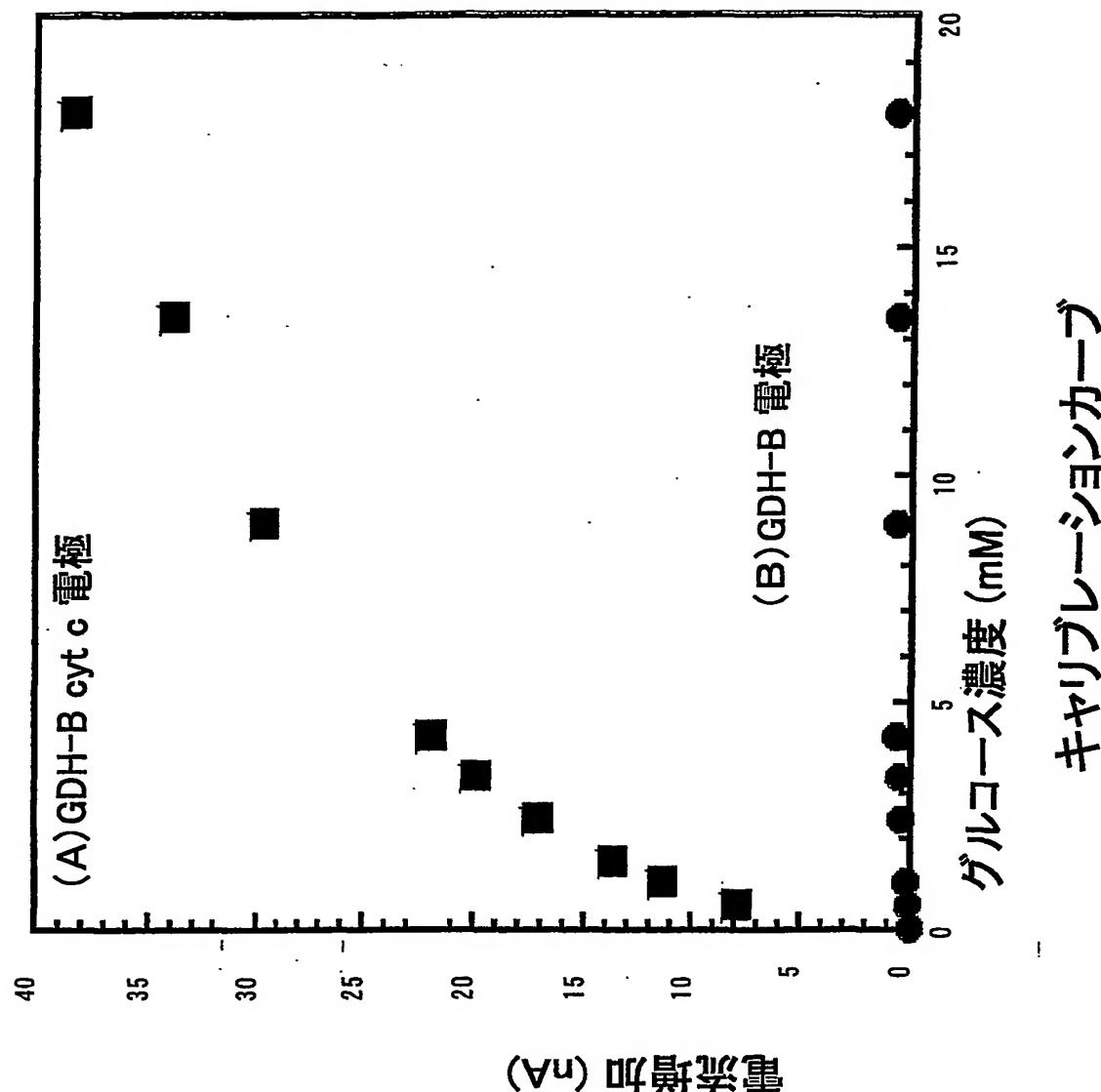


図 3

キャリブレーションカーブ

4 / 11

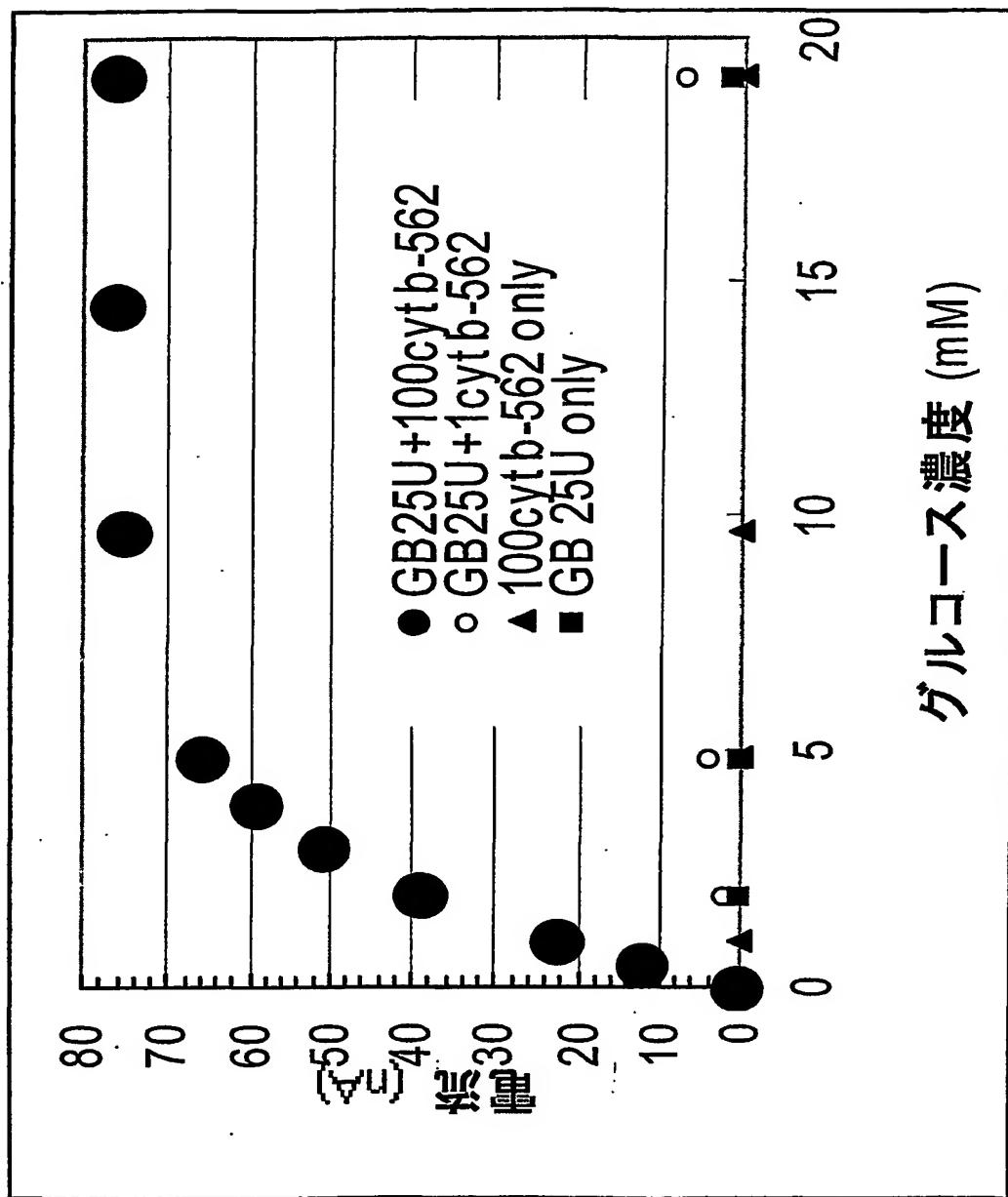


図4

5 / 1 1

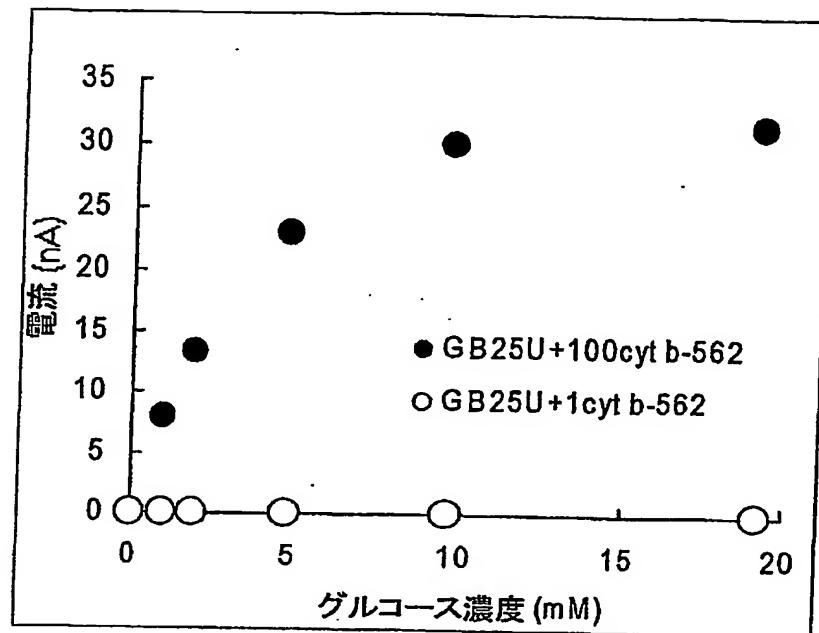


図 5

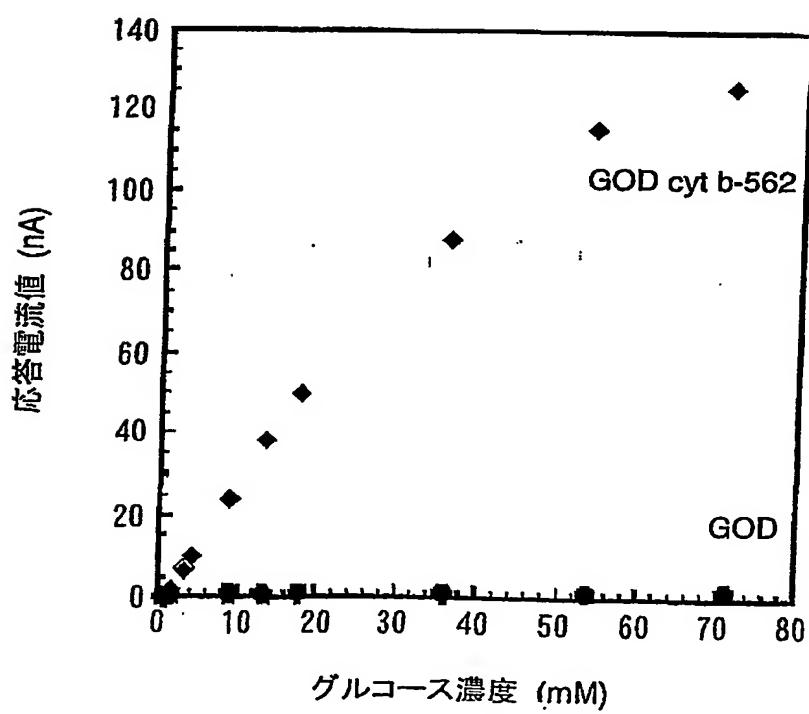


図 6

6/11

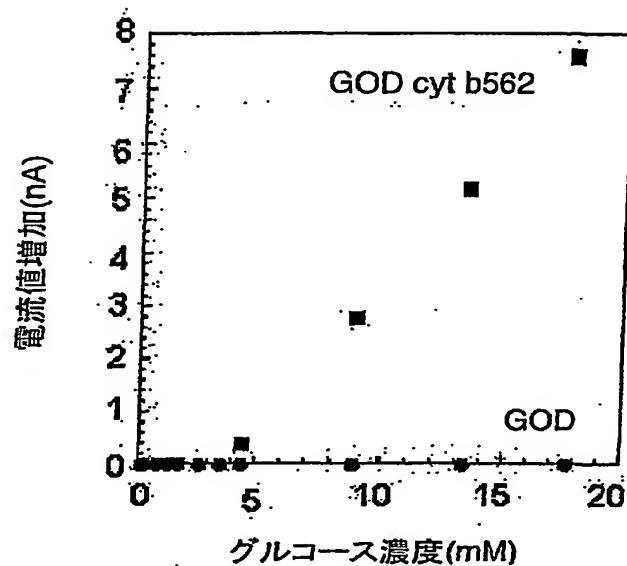


図 7

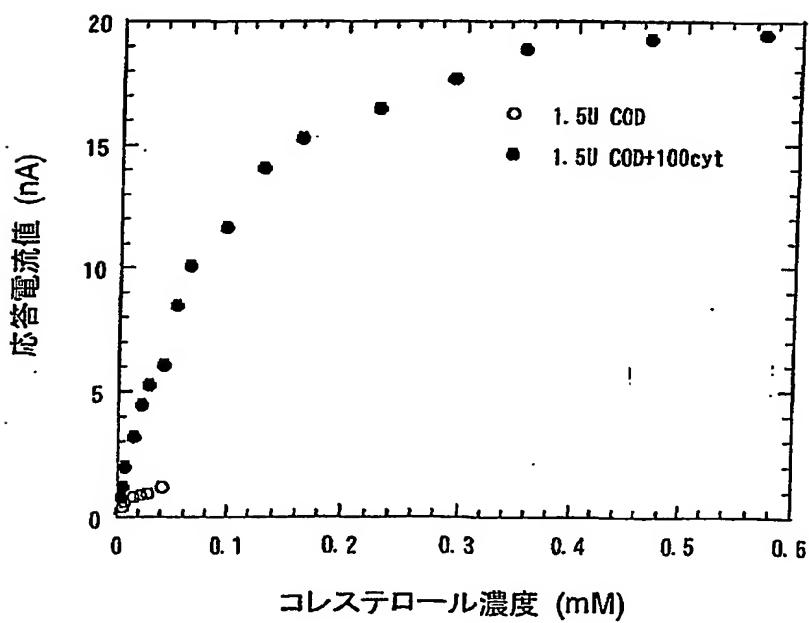


図 8

7 / 1 1

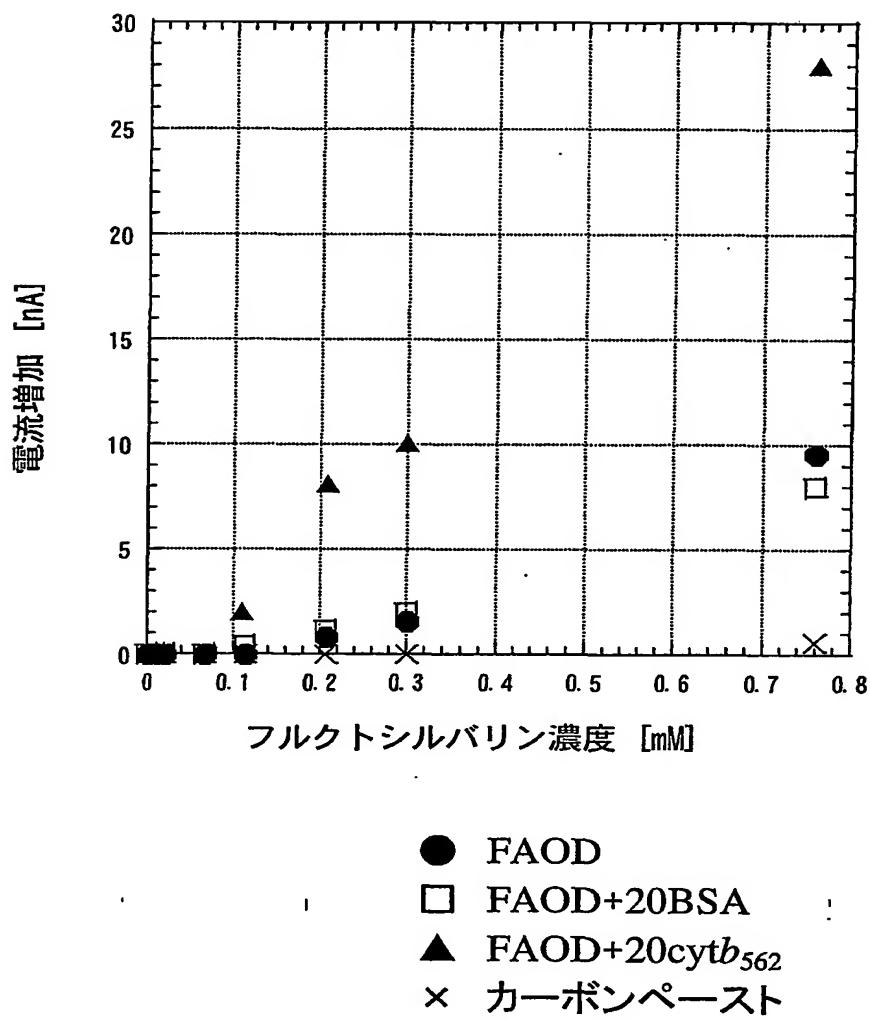


図 9

8 / 1 1

表1 アミノ酸配列のアライメント

| | <i>E.coli</i> | <i>E.coli</i> | <i>K12</i> | <i>O157 H1</i> | <i>S.typhi</i> | <i>S.typhi</i> | <i>K.pneu</i> | <i>Y.pesti</i> | <i>P.mut</i> | <i>S.pneu</i> |
|----------------------|---------------|---------------|------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|--------------|---------------|
| | (128aa) | (128aa) | 76(78) | 78(78) | 85(91) | 85(91) | 66(97) | 55(73) | 24(50) | 28(48) |
| | <i>E.coli</i> | <i>K12</i> | | | | | | | | |
| <i>E.coli</i> | (121aa) | | 100 | 84(91) | 84(91) | 69(98) | 53(88) | 24(49) | 21(59) | |
| <i>E.coli</i> | (100aa) | | | 86(93) | 86(93) | 73(100) | 58(90) | 28(53) | 20(57) | |
| <i>S.typhi</i> | (128aa) | | | | 100 | 72(95) | 52(89) | 26(46) | 21(56) | |
| <i>S.typhimurium</i> | (128aa) | - | | | | 72(80) | 52(68) | 26(46) | 28(48) | |
| <i>K.pneumoniae</i> | (129aa) | | | | | | 50(89) | 27(80) | 14(65) | |
| <i>Y.pestis</i> | (128aa) | | | | | | | 28(47) | - | |
| <i>P.multocida</i> | (124aa) | | | | | | | | | |
| <i>S.pneumoniae</i> | (71aa) | | | | | | | | | |

図10

9 / 1 1

| | | | | |
|----------------|---|---|---------------------------------|----|
| E.coli B.cytC | - | M.R.K.S.L.L.A.I.L.A.V.S.S.L.V.F.S.S.A.S.- | F.A.A.D.L.E.D.N.M.E.T.L.N.D.N.L | 10 |
| E.coli K12 | - | - | - | - |
| E.coli O157 H7 | - | - | - | - |
| S.typhi | - | M.R.K.S.L.L.A.I.L.A.V.S.S.L.V.F.G.S.A.V.- | F.A.A.D.L.E.D.N.M.E.T.L.N.D.N.L | 9 |
| K.pneu Kevb | M.G.R.K.K.R.L.A.M.L.A.V.S.A.F.A.L.G.S.A.S.- | A.F.A.D.L.G.I.E.D.M.D.T.L.A.E.N.L | 11 | |
| Y.pestis | - | M.G.K.T.L.M.A.L.I.T.A.A.L.L.S.T.S.S.L.V.- | M.A.A.S.V.A.D.D.M.E.T.I.A.E.H.Y | 12 |
| P.multocida | - | M.I.H.K.L.L.K.L.L.S.I.T.L.I.G.L.S.V.A.T.G.V.Q.A.N.V.R.A.E.M.N.Q.M.K.T.V.A | - | 13 |
| E.coli B.cytC | D.N.A.A.Q.V.K.D.A.L.T.K.M.R.A.A.A.L.D.A.Q.K.A.T.P.P.K.L.E.D.K.S.P.D.S.P.E | 50 | | |
| E.coli K12 | D.N.A.A.Q.V.K.D.A.L.T.K.M.R.A.A.A.L.D.A.Q.K.A.T.P.P.K.L.E.D.K.S.P.D.S.P.E | 51 | | |
| E.coli O157 H7 | D.N.A.A.Q.V.K.D.A.L.T.K.M.R.A.A.A.L.D.A.Q.K.A.T.P.P.K.L.E.D.K.S.P.D.S.P.E | 52 | | |
| S.typhi | D.S.A.P.E.L.K.A.A.L.T.K.M.R.A.A.A.L.D.A.Q.K.A.T.P.P.K.L.E.D.K.A.P.D.S.P.E | 53 | | |
| K.pneu Kevb | S.D.A.G.E.L.K.A.A.L.N.K.M.R.T.A.A.V.D.A.Q.K.E.T.P.P.K.L.E.G.K.A.A.D.S.A.E | 54 | | |
| Y.pestis | D.S.T.A.V.I.K.Q.D.L.Q.A.M.R.V.A.A.V.D.A.Q.K.G.I.P.T.K.L.K.S.K.V.E.D.S.P.E | 55 | | |
| P.multocida | K.D.V.A.E.F.Q.E.S.A.K.I.L.R.E.I.A.Q.S.S.E.K.R.P.S.S.I.T.N.-.-D.A.D | 56 | | |
| E.coli B.cytC | G.F.D.I.L.V.G.Q.I.D.D.A.L.K.I.A.N.E.G.K.V.K.E.A.Q.A.A.E.Q.L.K.T.T.R.N.A | 80 | | |
| E.coli K12 | G.F.D.I.L.V.G.Q.I.D.D.A.L.K.I.A.N.E.G.K.V.K.E.A.Q.A.A.E.Q.L.K.T.T.R.N.S | 81 | | |
| E.coli O157 H7 | G.F.D.I.L.V.G.Q.I.D.D.A.L.K.I.A.N.E.G.K.V.K.E.A.Q.A.A.E.Q.L.K.T.T.R.N.S | 82 | | |
| S.typhi | G.F.D.I.L.V.G.Q.I.D.G.A.L.K.I.A.N.E.G.N.V.K.E.A.Q.A.A.E.A.L.K.T.T.R.N.T | 83 | | |
| K.pneu Kevb | G.L.D.I.L.I.G.Q.I.D.G.A.L.K.I.A.N.E.G.K.V.K.E.A.Q.A.A.E.E.F.K.T.T.R.N.T | 84 | | |
| Y.pestis | G.M.D.V.L.I.G.E.I.D.G.A.L.L.A.D.Q.G.K.L.D.E.A.K.Q.A.A.Q.D.F.K.D.T.R.N.T | 85 | | |
| P.multocida | G.M.K.E.F.I.T.A.L.D.E.A.D.K.I.A.Q.E.G.N.L.D.A.A.K.T.A.K.K.L.F.D.I.R.N.V | 86 | | |

☒ 1 1

10 / 11

シグナル配列

| | |
|------|---|
| BcyE | M R K S L L A I L A V S S L V P S S A S |
| | ATG CCT AAA AGC CTG TAA GCT ATT CCT GCA GTC TCC TGG GAA TTC AGT TCT GCG TCG |
| KcyE | ATG GGG CGA AAA CGG TAA CGG ATG CTG GCT GTC TCT GET TTT GGG CTC GET TCA GCG TCG |
| | M G R K K R L A M L A V S A F A L G S A S |
| BcyE | P A A D L E D N M E T L N D N L K V I B |
| | TTC GCC GET GAT CTC GAA GAC AAT TG GAA ACC CTC AAC GAC GAA ATC GAA |
| KcyE | GCC TTC GCC GAG CTG GGC GAA GAC TG GAC ACT CTG GCA GAA AAC CTG CAA GTG GTC CAG |
| | A F A D L G E D W D T L A E N L Q V V Q |
| BcyE | K A D N A A Q V K D A L T K M R A A A L |
| | AAA GGG GAT AAC GGG GGG CAA GTC AAA GAC GCG TAA ACG AAG ATG CGC GCA GEG CTC |
| KcyE | AAG ACC TCC GAC GCC GGC GAG CTG AAA GCG GCG CTG AAT AAG ATG CGT ACC GGC GTC |
| | K T S D A G B L K A A L N K M R T A A V |
| BcyE | D A Q K- A T P P K L E D K S P D S P E M |
| | GAT GGG CAA AAA GCA AGG CGG CGG AAG CTC GAA GAT AAA TCA CGG GAC AGC CCG GAA ATG |
| KcyE | GAT GCT CAG AAA GAG ACC CGG CGG AAG CTG GAA GGC AAA GCG GGC GAC AGC GET GAG ATG |
| | D A Q K E T P P K L E G K A A D S A E M |
| BcyE | K D F R H G F D I L V G Q I D D A L K L |
| | AAA GAT TTC CGG CAC GGT TTC GAC ATT CTG GTC GGT CAG ATT GAC GAC GGG CTG AAG CTG |
| KcyE | AAA GAT TAC CGT CAC GGT CTG GAT ATT CTG ATC GGC CAG ATC GAC GGT GGG CTG AAG CTG |
| | K D Y R H G L D I L I G Q I D G A L K L |
| BcyE | A N E G K V K E A Q A A E Q L K T T R |
| | GCA AAT GAA GGT AAA GTA AAA GAA GGG CAG CAG GCT GGT GCA GAG CAA CTG AAA ACG ACC CGC |
| KcyE | GGG AAC GAA GGC AAG GTG AAA GAG GGG CAG GGC GGC GGG GAG GAG TTT AAA ACC ACC CGC |
| | A N E G K V K E A Q A A E F K T T R |
| BcyE | N A Y H Q K Y R |
| | AAC GGC TAT ACC AGA AGT ATC GTT AAT TCC TCA TTT CCC TGT TGC CAC TCA GGT AAC |
| KcyE | AAC ACC TAT CAT AAG AAG TAC CGG TAA CGG TTC TTT TC |
| | N T Y H K K Y R |

図 1 2

1 1 / 1 1

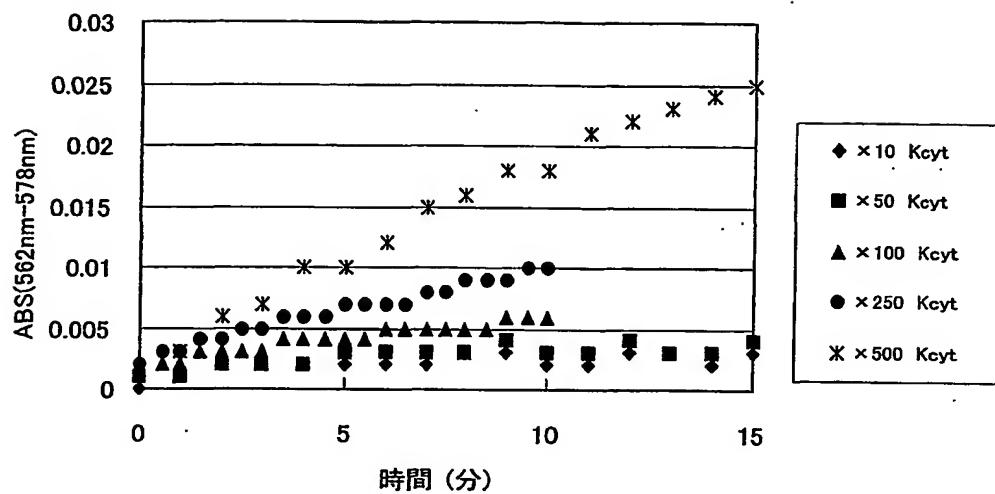


図 1 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N27/327

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2002 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2002 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2002 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|--|
| X A | JP 63-246651 A (Unitika Ltd.), 13 October, 1988 (13.10.88), Claims; example 1; Figs. 1 to 2 Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none) | 1,5,16,20 2-4,6, 8-15,17-19 21-25 |
| X A | JP 2001-21527 A (Akebono Research and Development Center Ltd., International Center for Environmental Technology Transfer), 26 January, 2001 (26.01.01), Claims; Par. Nos. [0026], [0047]; Figs. 1 to 8 Full text; Figs. 1 to 8 (Family: none) | 1,5,16,20 2-4,6, 8-15,17-19 21-25 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | |
|---|--|
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 03 May, 2002 (03.05.02) | Date of mailing of the international search report 18 June, 2002 (18.06.02) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Faxsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02191

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|--|
| X | JP 2001-21526 A (Akebono Research and Development Center Ltd., International Center for Environmental Technology Transfer), 26 January, 2001 (26.01.01), Claims; Par. Nos. [0023], [0026], [0064]; Figs. 1 to 5 | 1, 4, 5, 16, 18, 20 2, 3 |
| Y | Par. No. [0064] | |
| Y | JP 2000-350588 A (Koji HAYAIDE), 19 December, 2000 (19.12.00), Par. No. [0023] (Family: none) | 2 |
| Y | JP 6-78791 A (Masao KARUBE), 22 March, 1994 (22.03.94), Par. Nos. [0009] to [0021] (Family: none) | 3 |
| A | JP 2000-312588 A (Koji HAYAIDE), 14 November, 2000 (14.11.00), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 2000-81408 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 21 March, 2000 (21.03.00), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 2000-35413 A (Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory), 02 February, 2000 (02.02.00), Full text; Figs. 1 to 7 (Family: none) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 10-227755 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 25 August, 1998 (25.08.98), Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 2000-171428 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 23 June, 2000 (23.06.00), Full text; Figs. 1 to 11 & CN 1250161 A & EP 992589 A2 | 1-6, 8-24 |
| P, X | Koji HAYAIDE, Junko IWAI, Yuka TAKAHASHI, Junko OKUDA, "Tennen Denshi Juyotai Koteika Glucose Censer no Kochiku", The Electrochemical Society of Japan 68th Taikai Koen Yoshishu, 25 March, 2001 (25.03.01), page 364 | 1, 2, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 22, 23 |
| P, A | Junko OKUDA, Hiromi YOSHIDA, Koji HAYAIDE, "PQQ Glucose Dassuiso Koso to Cytochrome b562 tono Denshi Ido", CSJ: The Chemical Society of Japan, 79th Shunki Nenkai Koen Yokoshu II, 15 March, 2001 (15.03.01), page 896 | 1-6, 8-24 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/02191

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 7 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
No SEQ ID NO: is given.
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N27/327

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N27/327

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2002年

日本国登録実用新案公報 1994-2002年

日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|--|
| X A | JP 63-246651 A(ユニチカ株式会社) 1988.10.13 特許請求の範囲、実施例1、第1-2図 全文、第1-2図 (ファミリーなし) | 1, 5, 16, 20 2-4, 6, 8-15, 17-19 21-25 |
| X A | JP 2001-21527 A(株式会社曙ブレーキ中央研究所、財団法人国際環境技術移 転研究センター) 2001.01.26 特許請求の範囲、段落番号【0026】、【0047】、第1-8図 全文、第1-8図 (ファミリーなし) | 1, 5, 16, 20 2-4, 6, 8-15, 17-19 21-25 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.05.02

国際調査報告の発送日

18.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
黒田 浩一

2 J 9218

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

| C (続き) | 関連すると認められる文献 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|-----------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| X | JP 2001-21526 A(株式会社曙ブレーキ中央研究所、財団法人国際環境技術 移転研究センター) 2001.01.26 特許請求の範囲、段落番号【0023】、【0026】、【0064】第1 -5図 Y 段落番号【0064】 | 1, 4, 5, 16, 18, 20 2, 3 |
| Y | JP 2000-350588 A(早出広司) 2000.12.19 段落番号【0023】 (ファミリーなし) | 2 |
| Y | JP 6-78791 A(輕部征夫) 1994.03.22 段落番号【0009】-【0021】 (ファミリーなし) | 3 |
| A | JP 2000-312588 A(早出広司) 2000.11.14 全文、第1-3図 (ファミリーなし) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 2000-81408 A(松下電器産業株式会社) 2000.03.21 全文、第1-5図 (ファミリーなし) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 2000-35413 A(株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリ ー) 2000.02.02 全文、第1-7図 (ファミリーなし) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 10-227755 A (松下電器産業株式会社) 1998.08.25 全文、第1-2図 (ファミリーなし) | 1-6, 8-24 |
| A | JP 2000-171428 A(松下電器産業株式会社) 2000.06.23 全文、第1-11図 & CN 1250161 A & EP 992589 A2 | 1-6, 8-24 |

| C (続き) | 関連すると認められる文献 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| P X | 早出広司、若井順子、高橋由香、奥田順子、天然電子受容体固定化グルコースセンサの構築、電気化学会第68会大会講演要旨集、2001.03.25、P.364 | 1, 2, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 22, 23 |
| P A | 奥田順子、吉田裕美、早出広司、PQQグルコース脱水素酵素とチトクロムb562との電子移動、日本化学会第79春季年会講演予稿集II、2001.03.15、P.896 | 1-6, 8-24 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 7 は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

配列番号6が記載されていない。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.